Vol. III Maggio 1931 - A. IX Fasc. V

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

BOLLETTINO

DELLA

SEZIONE ITALIANA

SOMMAIRE

Elenco degli aderenti 154

Avviso 154

Arnaudi Ch. — L'action excitante de la phytase sur le développement de quelques microrganismes 155

Cuboni E. — Recherches sur la pathogénèse de l'avitaminose « B » 161

Mori N. — Experiences sur l'isopatinotherapie du Farcin cryptococcique des chevaux . . . 166

Paltrinieri S. — La sensibilisatrice antituberculeuse chez les veaux vaccinés par le B. C. G. . 167

Confalone Raffaele. — Recherches expérimentales sur l'influence réciproque de la vaccination anti-typhique et de la vaccination de Jenner 170

Pampana Emilio. — La dissociation microbienne dans les groupe typhus-paratyphus-dysentèrie, et dans les « Brucellae » et l'emploi de la trypaflavine comme son réactif 174

Sabatucci M. — Phenomènes de dissociation microbienne dans les staphylococques, révélables par Tripaflavine 175

Seppilli A. — Influence du calcium sur la production des pigments bactériens 178

Muggia A. — Recherches et observations sur la cultivabilité du virus de la tuberculose dans le sang 181

Casagrandi O. — Nouvelles recherches sur la maturation des ultravirus dans l'ambiant . . . 183

Capocaccia M. — Sur l'importance du facteur dose pour la détermination des réactions locales et générales produites par les bacilles de la tuberculose morts 184

Favero E. — Recherches sur l'isolement cultural du bacille de Koch dans le sang des tuberculeux 188

SOCIETÀ INTERNAZIONALE DI MICROBIOLOGIA

SEZIONE ITALIANA

Segue ELENCO DEGLI ADERENTI.

328. – Ascoli prof. Alberto - Via Podgora 5, *Milano.*

329. – Racchiusa dott. Santi - Viale S. Martino 246, *Messina.*

330. – Truffi prof. Giovanni - R. Clinica Dermosifilopatica, *Padova.*

AVVISO

Sono in vendita le annate arretrate del « Bollettino della Società Internazionale di Microbiologia », Sezione Italiana, al prezzo di Lit. 30 per l'Italia e Colonie e di Lit. 50 per l'Estero.

Le ordinazioni, accompagnate dall'importo, devono essere indirizzate alla Redazione del « Bollettino »: via Darwin 20, Milano.

ARNAUDI CH. – **L'action excitante de la phytase sur le développement de quelques microrganismes.**

En 1907, U. Suzuki, R. Joshimura et M. Takaishi [1] ont extrait du son de plusieurs céréales un ferment qui pouvait agir sur la phytine en la saponifiant en inoxite et acide phosphorique, et ils crurent qu'il s'agissait d'une action spécifique. Trois ans plus tard Contardi [2] demontrait que le même ferment décompose aussi la phytine synthétique, et plus recemment le même auteur [3] a démontré que l'estère esaphosphorique synthétique de l'inoxite sinistrose et l'estère synthétique pentaphosphorique de la québracite, sont hydrolysés par le même ferment.

Lorsque tout recemment Motoe Iwata [4] crût pouvoir identifier dans l'orizotoxine de Teru-Uchi [5] (cause de la polynévrite — selon cet auteur—) la lysocithine, Belfanti et Contardi [6] furent induits à étudier l'action de la phytase sur la lysocithine même, en vue de la large diffusion de la phytase dans ces mêmes matériaux alimentaires dont la somministration sauve les animaux de la polynévrite.

Bien que l'action de l'orizotoxine et des lysocithines sur la production de la polynévrite des animaux en avitaminose, ne soit pas encore suffisamment établie, les recherches de Belfanti et Contardi ont porté à la démonstration que la spécificité de la phytase pour la phytine en réalité n'existe pas.

En effet ce ferment — quelconque en soit l'origine — (graines et tissus végétaux, levure, moisissures diverses et organes animaux), agit rapidement sur les lysocithines en les hydrolisant en choline, acides gras, et acide glycérophosphorique; il peut entailler aussi certaines lécithines.

Même, si nous voulions juger la spécificité en rapport avec la rapidité de la réaction, on en dédurait une spécificité pour les lysocithines, sur lesquelles l'hydrolyse s'accomplit plus rapidement que non sur la phytine. La capacité de décomposition de la phytase sur les substances phosphorées vient donc à être allargie et de conséquence sa fonction dans les procès du métabolisme des phosphatides augmente son importance.

Ces constatations de Belfanti et Contardi, viennent à poser le problème de l'influence de ce ferment sur la fermentation alcoolique pour laquelle on admet aujourd'hui que les composés phosphoreux ayent la plus grande importance.

---

(1) *U. Suzuki, R. Yoshimura* e *M. Takaishi*, Bull. of the Coll. of Agric. Tokyo, 7, 504, 1907.

(2) *Contardi*, R. Acc. Lincei, vol. XIX, serie 5ª, fasc. 1º, 1910.

(3) *Contardi*, Giorn. di Chim. Industriale Milano, 1931.

(4) *Motoe Iwata*, Bioch. Zeitschr., Bd. 224, Hft 4-6, pag. 430, 1930.

(5) *Teru Uchi*, The Japan Medical World, 1929, vol. IX, n. 10.

(6) *Belfanti* et *Contardi*, Lo Sperimentale, 1931. — Giornale di Chimica Industriale, 1931.

M.r le Prof. Belfanti, que je remercie ici devotement, m'a conseillé d'entreprendre une série d'observations sur l'action de la phytase sur le développement et sur les activités fermentatives des blastomycètes, que j'ai étendues par la suite a celles d'autres microrganismes. Je publierai à part plus largement les résultats obtenus et la documentation rélative, que je reporte dans cette note, en résumen.

*
* *

Le ferment a été preparé selon plusieures techniques et avec de différents matériaux; en général, j'ai fait usage dans mes observations des ferments utilisés dans les recherches chimiques et biologiques de Belfanti et Contardi et de Cuboni.

J'ai étudié avant tout l'action de la phytase sur le développement des blastomycètes et sur la fermentation alcoolique. Cette recherche a été faite, en determinant la production de CO^2 dans des tubes à essai de fermentation selon Smith; ou bien en prenant comme indicateur de la fermentation, l'alcool produit. La durée de la fermentation a varié de 3 heures, pour les recherches sur le CO^2, à 24 heures, pour celles rélatives à l'alcool. Comme liquide de fermentation, j'ai fait usage de celui de Hansen, qu'on ensemençait avec des quantité exactement mésurés de *Saccharomyces Ellipsoideus*, provenantes de cultures de 24 heures: et auquel on ajoutait de différentes quantités de phytase.

Dans toutes ces déterminations, j'ai obtenu toujours, en comparaison avec le contrôle sans phytase, une notable augmentation (même du double) soit dans les séries se referant au CO^2, soit dans celles dans les quelles on déterminait l'alcool. On a étudié en même temps l'action de la phytase sur le developpement des blastomycètes. A tel but, on a préparé des plaques de gélose au liquide de Hansen auxquelles on ajoutait — au moment de la solidification — de la solution aqueuse de phytase (0,1–0,5 cmc. pour chaque plaque). Dans chaque plaque on portait ensuite une öse de suspension de *Sacch. Ellipsoideus*, selon la technique suivie pour les plaques d'isolement par dissémination.

L'action du ferment dans ces cas, est aussi prompte et évidente que dans les fermentations.

En effet, déjà après 24 heures on note dans les plaques avec phytase, de nombreuses petites colonies du saccharomycète, de la grandeur d'une tête d'épingle, telles qu'on les observe dans les plaques de contrôle, seulement après 4 jours. La différence de grandeur se maintient aussi dans les jours suivants: les colonies dans les plaques contenantes de la phytase — aussi à la moindre dose de 0.1 cmc. — surpassent toujours du double la grandeur des contrôles.

Une autre séries d'observations a été faite sur les blastomycètes, en examinant ces microrganismes en multiplication, moyennant la culture monocytogénétique, selon la technique de Lindner.

On ajoutait à des tubes d'essai de 10 cmc. de liquide de Hansen, des quantités croissantes de solution aqueuse de phytase (de 0,1 à 1 cmc.) et l'on-y suspendait le *Saccharomyces Ellipsoideus* dans la proportion déterminée d'avance et que nous assurait presque constamment une cellule par goutte. En faisant des séries de gouttes du liquide contenant de la phytase et d'autres, pour contrôle, de liquide sans ferment, j'ai pu suivre jour par jour, le bourgeonnement des cellules isolées et la formation de petites colonies microscopiques au dedans des gouttes mêmes. Dans ce cas aussi, l'action de la phytase a été prompte et constante. La différence de développement avec les gouttes de contrôle a été très évidente.

En synthèse: on peut établir une différence de 4 jours entre le degrés de developpement des deux séries. Ces observations m'ont confirmé que la rapidité de bourgeonnement et aussi de reproduction, était hâté par la présence de la phytase, comme j'avais pu observer précédemment en faisant des pièces microscopiques avec les colonies dévéloppées sur les plaques de gélose de Hansen avec phytase.

J'ai aussi étudié, tout particulièrement, la fermentation lactique en suivant non seulement le développement culturel du *B. Bulgaricus*, mais faisant en plus une série d'épreuves acidimétriques sur des liquides fermentés avec du *B. bulgaricus*, avec et sans phytase. A tel but j'ai fait usage d'un lait digéré stérile que j'avais étudié il y a quelques temps [1] et qui serve très bien pour des recherches de ce genre.

L'action excitante de la phytase, se manifeste déjà après 24 heures d'observation et continue à s'accentuer pendent les jours suivants. Après 5 jours de fermentation, les liquides contenants de la phytase, ont une acidité presque trois fois supérieure à celle des contrôles.

* * *

Pour les autres microrganismes étudiés, je me suis borné à observer l'aspect culturel sur des milieux solides, dans des tubes à essai additionés ou non de phytase.

J'ai ainsi observé el *B. diphteriae*, le *Diplococcus gonorrhoea*, le *Diplococcus pneumoniae*, *le Diplococcus meningitidis* dans des tubes à essai de gélose commune adjointe de 0,5 cmc. de solution de phytase. La *Thielavia basicola* et la *Clorella prothotecoides*, sur gélose de Wemer, adjointe de 0.5 cmc. de solution de phytase. L'*Azotobacter chroococcum* sur silicogel de Winogradski adjoint de phytase.

(1) *C. Arnaudi*, Boll. Ist. Siert. Milanese, 1928.

L'action de la phytase sur tous ces microrganismes choisis parmi les pathogènes pour les animaux et les végétaux et parmi les terricoles, n'a pas été douteuse. Les cultures développées sur les milieux contenants du ferment, se caracterisaient par la rapidité du développement et par leur richesse, et leur comparaison avec les contrôles mettait hors de doute l'action excitante de la phytase.

Un interêt particulier, présentent les observations faites sur les anaérobies. J'ai été porté à étudier l'action de la phytase sur ces microrganismes, par le fait, bien connu que leur développement est favorisé par la présence de morceaux de tissus végétaux et animaux, surtout de foie, dans les milieux culturels communs. Lesquels tissus contiennent, parmi les autres ferments, aussi la phytase.

En ajoutant de la phytase au liquide de Hansen, j'ai pu obtenir un bon développement du *B. Venturelli* qui ne croit pas dans le liquide de Hansen pur. La même constatation a été faite pour le *B. Beljantii*, tandis que je n'ai pas pu constater une action favorable sur le *B. felsineus*, peut-être a cause de sa stricte anaérobicité.

J'ai pu obtenir aussi le développement du *B. perfringens* sur liquide (bouillon commun additioné de 1/10 de solution de phytase) et sans particulières prévoyances d'anaérobiose.

Enfin, sur gélose commune inclinée, à laquelle on ajoutait, après la solidification, 1 cmc. de solution de phytase, j'ai obtenu le developpement du *B. perfrigens*, du *B. Novyi*, du *B. botulinus*, du *B. septicus*, du *B. verrucosus* qui, naturellement, ne se multipliaient pas, dans les contrôles respectifs sur gélose commune.

Les observations microscopiques faites sur les microrganismes des cultures contenantes de la phytase, ne présentaient pas des caractères particulièrs ou des différences en comparaison avec ceux normaux, sauf les bourgeonnements plus abondants dans les blastomycètes, que nous avons déjà rappelés et, en général, ces signes de division cellulaire accentuée tels que l'abondance, en formes streptobacillaires observées pour le *B. bulgaricus*.

***

Lorsqu'on déterminait le CO^2 dans la fermentation alcoolique, le ferment a été utilisé tel qu'on l'obtient par la précipitation alcoolique des extraits aqueux ou hydro-alcooliques des matériaux originaires, en le ajoutant directement aux liquides de fermentation. Dans ce cas, la brièveté de l'expérience et la probable pauvreté en germes du ferment, ne rendaient pas nécessaire la stérilisation. Pour ces épreuves, j'ai fait aussi usage du ferment adsorbé sur Kieselgur et sur charbon végétal et j'en ai obtenu des résultats positifs.

Dans les autres expériences, on a toujours fait usage d'une solution aqueuse de phytase, sterilisé au moyen de la filtration par bougie. Dans les séries d'expériences dans lesquelles on a fait usage des géloses de Hansen et de Wemer, la phytase a été ajouté à la dose de 0,5 cmc. de solution, pour chaque tube, et cela directement, dans la gélose avant de la stériliser à une atmosphère pour 20 minutes; par cela, reste confirmée la thermorésistance du ferment.

La thermorésistance du ferment, a été en effet constatée plusieures fois et l'on put voir que si l'action de la chaleur en diminue un peu l'activité fermentative (soit pour ce que regarde la décomposition de la lysocithine, soit pour l'action excitante sur le développement des germes) tout de même elle ne disparait pas complètement, même si le ferment est mis pour 5-10' à bain-marie en ébullition; en outre, en le laissant en repos après le réchauffage, à température commune, pour quelques heures, il reprend une activité presque normale.

Le ferment est détruit seulement par une ébullition directe prolongée ou bien par ébullition après une alcalinisation même très faible. C'est précisement en faisant usage du ferment ainsi traité, que j'ai pu constater que son addition aux milieux culturels n'avait aucune action, c'est à dire que le ferment additionné agit réellement par activité fermentative et non pas comme aliment des microbes.

Des données, que nous avons referé ici, il résulte en résumé que la phytase a une action eccitante nette sur la réproduction des germes et qu'elle permet aussi le développement des anaérobies sans de particulières prévoyances de technique, et cela dans la même mésure des milieux culturels à base d'organes.

Il faut rappeler à ce point les réserves que Belfanti et Contardi ont fait tout recemment sur la nature des ferments extraits des organes animaux et des tissus végétaux, avec les méthodes élaborés pour la préparation de la phytase. En suivant les méthodes des auteurs japonais, on obtient réellement des mélanges de ferments à propriétés diverses qui contiennent, outre que la phytase, aussi, par exemple, l'amylase. Lesquels de ces ferments agissent favorablement sur les microrganismes? La difficulté de séparer les ferments différents, rendra difficile la solution du problème en admettant qu'il s'agisse réellement de ferments distints et non de distinctes propiétés d'un seul ferment. Un premier essai que j'ai fait à tel but, demontrerait que l'action amylolytique exercée par le complexe de ferments n'entre pas dans le mécanisme du développement des germes. En agissant avec des temperatures croissantes, j'ai constaté que l'action amylolytique disparaissait avant celle hydrolysante les lysocithines et que parallèlement les ferments agissent encore sur les germes, quand ils n'ont plus aucune action sur l'amidon.

C'est bien curieux d'ailleurs, que les mêmes méthodes qui servent pour préparer la phytase, soient adoptés pour obtenir la vitamine *B*, de sorte que Belfanti et Contardi ont pu affirmer *que seulement les matériaux dans lesquels on peut demontrer la présence de la phytase, peuvent sauver les animaux en carence de vitamine B.*

Cette vision fermentative du problème de la polynévrite, trouve un rencontre parfait à l'égard des microrganismes. En effet, les mêmes matériaux supposés vitamineux, que dans les expériences de Belfanti et Cuboni, n'agirent pas sur la lysocithine et ne sauvèrent pas les animaux en avitaminose, n'ont demontré aucune action favorable sur le développement de la levure.

Toutes ces observations sur l'action de la vitamine *B.* sur les levures, qu'avaient donné lieu à des méthodes pour le dosage de la vitamine,au moyen de la fermentation alcoolique, trouvent aussi leur explication dans les opinions de Belfanti et Contardi. Les facteurs divers dans lesquels la vitamine *B* a été distinguée jusqu'au présent, trouveront peut-être un point de repaire et une explication dans la distinction des divers ferments contenus dans le mélange.

D'autre part, les expériences regardant les actions favorables des extraits végétaux sur le développement des microrganismes, peuvent être aisement expliquées par la présence dans les tissus mêmes de la phytase et des ferments qui l'accompagnent, au lieu de la supposée vitamine *B.*

Et il ne faudra pas dire que ces conclusions ne font que déplacer le problème de la vitamine *B* vers la phytase: c'est-à-dire d'un mot à un autre; parceque de la phytase ou bien de ce complexe de ferments que nous obtenons dans sa préparation, on connait aujourd'hui d'importantes propriétés biochimiques qu'ont un grand rôle dans le métabolisme des phosphatides et des hydrates de carbone, dont l'importance pour la physiologie des végétaux et des animaux est bien connue.

Il faut démontrer encore si ce soient ces mêmes activités biochimiques qui jouent un rôle excitant sur les microrganismes. Tout de même, elles representent, en tout cas, un ensemble de faits chimiques beaucoup mieux définis que toutes nos connaissances sur la vitamine *B.* et qui donnent au problème une orientation nouvelle riche de promesses.

Laboratoire de Microbiologie Agricole
de l'Institut Sérothérapique de Milan.

CUBONI E. – **Recherches sur la pathogénèse de l'avitaminose " B ".**

La présente communication a pour but de donner, en abrégé, une relation préliminaire sur les résultats des épreuves qui visent, d'un côté, à contrôler la véridicité de l'assertion de quelques AA. japonais à propos d'une nature toxique supposée du béribéri et de l'identité supposée du poison qui déterminerait cette affection avec la lysocithine, et, de l'autre côté, à définir les rapports très intimes qui, d'après MM. Belfanti et Contardi, existeraient entre la vitamine dite « B » et certains enzymes.

Rapports éventuels entre l'avitaminose, l'orizotoxine et la lysocithine. – Comme on le sait, M. Teru-Uchi et ses Collaborateurs (1) ont affirmé d'avoir démontré que l'avitaminose «B», ou béribéri expérimental des pigéons, est causée par l'action d'une substance toxique qu'on peut extraire du riz pilé (orizotoxine); successivement M. Motoe Iwata (2) a constaté que dans le riz pilé il y a la lysocithine — une substance qui se forme de la lécithine (Delezenne (3), Belfanti (4) par l'action de certains ferments — et il a posé la question de rapports éventuels entre cette lysocithine du riz et l'orizotoxine de Teru-Uchi. Or, à la suite de ses affirmations, j'ai été chargé par M.le Prof. Belfanti, d'établir:

1) si l'orizotoxine, extraite suivant le procédé de Teru-Uchi, possède réellement l'action toxique caractéristique que cet A. lui a attribué;

2) si en effet la lysocithine peut donner lieu à une symptomatologie semblable à celle décrite par Teru–Uchi pour l'intossication moyennant l'orizotoxine;

3) si la lysocithine injectée dans des animaux nourris avec du riz décortiqué peut accélerer l'apparition de la polynéurite, en comparaison de ce qu'il arrive chez les contrôles nourris de la même façon, mais non pas traités moyennant la lysocithine.

Les résultats peuvent être résumés comme suit:

1) M. Teru-Uchi et ses Collaborateurs ont rapporté l'expérience suivante: un poulet nourri chaque jours avec 70 gr. de riz non pilé (on dirait donc un poulet normalement alimenté) a été injecté tous les jours moyennant la quantité d'orizotoxine extraite de 175 grammes de riz pilé; au bout de 4 jours l'animal présenta une paralysie et il succomba après 7 jours, tandis que le témoin n'ayant pas été soumis aux injections, survecut trois semaines environ. Mois, j'ai administré à trois poulets une alimen-

(1) *Teru Uchi*, The Jap. Med. World, 1929, n. 10, vol. IX, pag. 308.
(2) *Motoe Iwata*, Bioch. Zeitschr., 1930, Bd. 224, pag. 430.
(3) *Delezenne*, C. R. Soc. Biol., 1911, vol. 70.
(4) *Belfanti*, Boll. I. S. M., 1925, fasc. II, pag. 77.

tation normale, en leur injectant, tous les jours et pendant 22 jours consécutifs, l'orizotoxine extraite de 280 gr. de riz; aucun de ces trois animaux n'a présenté des troubles; leur poids, périodiquement contrôlé pour tous les animaux, a augmenté d'un façon régulière chez deux poulets et a baissé chez le troisième (de 1200 gr. à 870 gr.); la température du corps n'a pas montré de modifications. Les animaux ont été abandonnés après un mois environ à partir du début du traitement et ils étaient tous en bonne santé.

M. Teru-Uchi et ses Collaborateurs ont rapporté que de deux poulets nourris chaque jours avec 70 gr. de riz pilé, broyé et administré sous la forme de pillules, l'un a présenté une paralysie au bout de 16 jours et a succombé après 18 jours, tandis que l'autre, qui avait été injecté moyennant l'orizotoxine extraite de 140 gr. de riz pilé, a présenté paralysie au bout de 4 jours, en succombant après 7 jours. J'ai mis 6 poulets à un régime également carencé, c'est-à-dire: 70 gr. chaque jours de poudre de riz en pillules. Trois de ces animaux ont été soumis tous les jours à l'injection d'une émulsion aqueuse d'orizotoxine, correspondant à 140 gr. de riz; les autres trois (les témoins) ont été laissés sans aucun traitement. Tous les animaux ont montré une considérable perte progressive de leur poids et un abaissement prononcé de leur température dans les jours qui ont précédé la mort. Le délai de temps qui s'est écoulé du début du régime carencé jusqu'à la mort, a été de:

13, 22, 25 jours	21, 22, 38 jours
avec l'orizotoxine	sans l'orizotoxine.

Les phénomènes paralytiques, ainsi que le tableau anatomo-pathologique des deux groupes d'animaux, n'ont pas présenté de différence essentielle entre les groupes mêmes.

De ces essais il ressort que l'orizotoxine ne possède ni cette action toxique caractéristique vis-à-vis des poulets maintenus avec une alimentation normale, ni cette action accélératrice de l'apparition du béribéri, que M. Teru-Uchi et ses Collaborateurs lui avaient attribué.

II. – Dans le but d'établir si la lysocithine peut exercer une action analogue à celle qui fut assignée à l'orizotoxine, on a injecté journellement 5 poulets, maintenus à un régime normal, moyennant une solution de lysocithine à l'un pour cent; deux de ces poulets en ont reçu 30 cmc. en total, et trois, 26 cmc. Pendant ce traitement le poids du corps a augmenté chez deux animaux; chez deux autres il abaissé d'abord et puis il a augmenté; enfin, chez un poulet, le poids a baissé progressivement; la température a démeuré toujours inaltérée et, au cours des trois semaines pendant lesquelles on a fait cette expérience, on n'a jamais observé de phénomènes paralytiques. Les deux poulets ayant reçu 30 cmc. de lyso-

cithine et dont un était le poulet qui avait maigri (de 1400 gr. à 850 gr.) ont été sacrifiés et leur nécropsie n'a mis en évidence rien de remarquable.

Dans le pigeon entretenu avec un régime normal, l'injection intramusculaire pratiqué en deux fois seulement, avec un quantitatif relativement élevé de lysocithine, savoir: un cmc. de lysocithine au 5% en deux injections pratiquées avec l'intervalle d'un jours, a provoqué la mort de l'animal, précédée de graves lésions locales au point de l'injection. Avant la mort du pigeon on n'avait constaté ni convulsions, ni paralysie, mais il y avait eut de la diarrhée verte, probablement due à une élimination augmentée de pigments biliaires, causée par l'action hémolytique qui est propre de la lysocithine. Nous irons relater plus tard à propos du résultat de l'examen histologique comparatif des organes appartenants aux animaux morts par suite d'empoisonnement de lysocithine, et de ceux qui appartiennent aux animaux morts par suite de l'avitaminose « B ».

III. – Afin d'établir si la lysocithine peut accélérer l'apparition des phénomènes nerveux chez les volatiles entretenus avec du riz pilé, on a mis 6 poulets à un régime identique, c'est-à-dire, à 70 gr. chaque jour de poudre de riz mondé, confectionné en pillules; trois de ces poulets ont reçu des injections quotidiennes d'une solution de lysocithine à l'1% (respectivement 32, 38, 78 cmc.), tandis que les autres trois, les témoins, n'ont pas été soumis au traitement. Tous les six animaux ont montré une diminution progressive de leur poids et une hypothermie terminale. Le délai de temps s'étant écoulé à partir du début du régime carencé, jusqu'à la mort des animaux, a été de:

19, 23, 52 jours,	21, 22, 38 jours,
avec la lysocithine	sans la lysocithine

Les phénomènes paralytiques apparus chez les deux groupes d'animaux, ainsi que leurs tableaux anatomo-pathologiques, n'ont pas montré de différence essentielle.

Deux autres poulets, alimentés avec du riz pilé ont reçu tous les deux jours, 5 injections de gr. 0,020 de lysocithine chacune, mais comme ils n'ont montré aucun symptôme précoce de polynévrite, le traitement a été interrompu.

Deux pigeons entretenu avec du riz pilé ont reçu 5 injections de gr. 0,010 de lysocithine; ils n'ont présenté aucun symptôme polynéuritique précoce, de sorte que les injections ont été suspendues. Enfin, de 12 pigeons alimentés avec du riz pilé et sous des conditions identiques, deux ont été soumis à des injections quotidiennes de 0,50 cmc. de lysocithine au 5%; l'un d'eux a succombé à la suite de trois injections, sans avoir présenté aucun signe clinique ou anatomo-pathologique rapportable au béribéri expérimental; l'autre animal a présenté une paralysie après

9 injections, c'est-à-dire au vingtième jour à partir du début du régime avitaminique, mais les autres pigeons non injectés avec la lysocithine, ont présentés, eux aussi, une paralysie qui se manifesta à peu près à la même époque.

La lysocithine donc n'a pas le pouvoir d'accélérer l'apparition de la polynévrite due à l'avitaminose « B ».

Vitamine B et phytase. – On sait depuis longtemps que dans la bâle et dans les bourgeons du riz il existe un ferment, dénommé *phytase*, qui est apte à décomposer la phytine en acide phosphorique et inosite (1). Ce ferment est, probablement, à identifier avec la phosphatase α isolée, elle aussi, de la bâle et du bourgeon du riz, par M. Belfanti (2); en effet ces deux ferments décomposent la phytine aussi bien que la lysocithine et, dans cette dernière, la scission effectuée par le ferment se traduit par un trouble du mélange qui auparavant était limpide, trouble accompagné de l'apparition de choline libre et susceptible d'être démontrée à l'aide de la réaction micro-chimique de Fleurence. (Pour des reinseignements plus détaillés nous renvoyons le lecteur au travail original de M. Belfanti (3).

Plusieurs analogies existants entre les propriétés qui seraient caractéristiques de la Vitamine « B » et celles bien connues de la phytase, et notamment le fait que les procédés qu'on emploit soit pour extraire la phytase soit pour extraire la Vitamine B, sont essentiellement égales et que ces deux substances ou propriétés sont rapidement détruites dans un milieu alcalin et sont absorbées par les mêmes absorbants, ont entrainé MM. Belfanti et Contardi a rechercher si la Vitamine B et la phytase possèdent, *in vivo*, la même action curative vis-à-vis du béribéri chez les pigeons et la même action préventive contre la polynévrite due à l'avitaminose. Pour instituer ces épreuves nous avons employé la phytase extraite du bourgeon et de la bâle du riz; ce ferment, préparé en solution aqueuse stérile, était introduit, au cours des épreuves de traitement du béribéri éclaté, moyennant des injections intra-musculaires; par contre, dans les recherches sur son pouvoir préventif, on le préparait à l'état sec et on l'administrait par voie buccale, mélangé avec de la poudre de riz pilé, de façon à en former des pillules. Le ferment fut préparé par MM. Belfanti et Contardi. Les animaux qu'on employa pour les essais en question, furent surtout des pigeons, et, en quelques cas, des poules et des dindons (Meleagris gallopavo L.) aussi.

Chez sept pigeons qui montraient le syndrôme béribérique on a donc injecté par voie sous-cutanée de la phytase obtenue de la bâle et du bour-

(1) *Suzuki* et ses collab., Bull. of the Coll. of Agr. Tokyo, 1907, 504, 7, pag. 54.
(2) *Belfanti*, Rend. Ist. Lomb. Scienze e Lettere, 1921, vol. 64, fasc. I-V.
(3) *Belfanti*, Arch. It. de Biologie, 1931 (in corso di stampa).

geon de riz, ayant une activité vérifiée (épreuve de l'aptitude à séparer la lysocithine); l'effet curatif a été complet et vraiment surprenant pour la rapidité de son apparition. En général, deux heures environ après l'injection de 2 cmc. d'une solution riche en ferment, l'animal ne présente plus les phénomènes convulsifs et paralytiques et la température de son corps — qui, pendant la période où les symptômes nerveux sont éclatés, est constamment basse — revient à la normale. Cependant on obtient des résultats sûrs seulement si l'on intervient aussitôt le syndrôme béribérique va se dessiner; si l'on attend trop, il est parfois impossible d'obtenir la guérison à l'aide des injections de phytase.

En pratiquant des injections répétées de phytase chez un poulet nous avons vu que des paralysies étant apparues au bout de 26 jours d'un régime de riz pilé, se sont arrêtées, tout en ne disparaissant pas, et elles sont restées stationnaires pendant quelques jours, après lesquels l'alimentation de l'animal a été complétée par de la phytase administrée *per os* (la mort a suivi 25 jours après l'apparition des paralysies). Toutefois, chez les poulets, ainsi que chez les dindons, il est , en général plus difficile d'atteindre des résultats thérapeutiques autant satisfaisants que ceux que l'on obtient chez les pigeons.

Il est bon de remarquer que trois pigeons traités dès l'apparition des paralysies, moyennant des doses abondantes de préparations qui avaient été declarées riches en vitamine B mais qu'on avait trouvées dépourvues de phytase, sont morts au bout de quelques heures seulement; ces épreuves ont une signification de contrôle « blanc » de l'action des solutions renfermant de la phytase.

Lorsque la phytase extraite de 2 gr. de bourgeon et apprêtée à l'état sec en mélange avec de la phytine, est administrée tous les jours par voie buccale à des poulets et à des pigeons alimentés avec du riz pilé, elle a le pouvoir de les maintenir en vie pour longtemps. Actuellement nous avons à l'observation des pigeons alimentés avec du riz pilé additionné du susdit mélange de phytine et phytase; or, ces animaux sont en conditions générales bonnes, le poids de leur corps est stationnaire ou bien légèrement augmenté; ils ont déjà dépassé respectivement le 34ème, le 33ème et le 30ème jour depuis le début du syndrôme paralytique lequel avait été traité et guéri à temps opportun, par les injections de phytase.

Lorsque cette même phytine additionnée avec de la phytase est administrée encore par voie buccale, à la dose quotidienne surmentionnée, à des pigeons alimentés avec du riz pilé, elle peut prévenir l'apparition du béribéri; nous avons à l'observation un group de six pigeons chez lesquels le régime carencé avait été initié en même temps; deux de ces animaux avaient reçu, chaque jours, dès le 15ème jour de régime carencé,

un gramme de phytine mélangée avec de la phytase, et les autres avaient été laissés comme contrôles. Pour ce qui se rapporte à l'apparition du béribéri, on a eu les résultats suivants:

Deux pigeons recevant de la phytase:	*Quatre pigeons-témoins alimentés avec du riz pilé:*
Aucun symptôme jusqu'au 61ème jour à partir du début du régime carencé.	Paralysie après 13, 14, 20 et 30 jours.

Nous pensons de pouvoir affirmer que seulement les substances renfermant de la phytase possèdent cette action curative caractéristique du béribéri des pigeons qui est attribuée à la Vitamine dite « B » et que cette action est tout à fait absente dans les substances qui ne renferment pas de la phytase. D'après cela on est autorisé à admettre qu'entre la phytase et la vitamine « B » il existe des rapports très intimes et, avec toute vraisemblance, des rapports d'identité.

Institut Sérothérapique de Milan.

MORI N. – **Experiences sur l'isopatinotherapie du Farcin cryptococcique des chevaux.**

Par une publication très récente sur les Isopatines [1] — c'est le nom qu'on donne aux produits immunitaires spécifiques et aspécifiques que j'ai obtenu par la désintégration du matériel pathologique des infections et des tumeurs correspondantes — j'ai fait connaitre les résultats de la première expérience de cure du Farcin cryptococcique des chevaux, faite en 1918, expérience pour laquelle je m'étais servi d'une Isopatine préparée avec du matériel pathologique prélevé sur les lésions spécifiques de cette infection mycotique.

Les cinq animaux du Dépôt d'Élevage de quadrupèdes de Persano — dont un état déjà si gravement atteint qu'on l'avait destiné à l'abattoir — furent traités avec l'Isopatine inoculée en fortes doses par voie intra-veineuse: cette cure donna de si bons resultats qu'on en fit un rapport au Ministère de la guerre.

À cause d'autres études qui m'ont pris tout mon temps, je n'ai plus pu continuer les expériences de cure du Farcin cryptococcique avec l'Isopatine anti-farcin; ce n'est qu'en 1927 que j'ai pu reprendre ces recherches.

---

(1) *N. Mori*, « Le isopatine ». Annali Italiani di Chirurgia, vol. VIII, fasc. IX, 1929.

Les expériences de 1927, faites toujours au Dépôt de Persano e continuées pendant le premier sémestre de l'année 1928, furent recommencées en inoculant, par voie intraveineuse avec les mêmes doses dont on s'était servi en 1917: ensuite, toujours par voie intra-veineuse on injecta des doses réduites qu'on augmentait par degrés: enfin on fit le traitement isopatinique par voie sous-cutanée avec des doses variables par intervalles irreguliers.

Il a ainsi été possible de démontrer, qu'en se servant de la voie intraveineuse on obtient des résultats plus surs si l'on emploit de doses inférieures à celles qui semblaient être les plus utiles en 1917; en outre la voie sous-cutanée est aussi efficace que celle intra-veineuse et elle est même préférable; enfin par voie sous-cutanée on peut obtenir des résultats thérapeutiques très satisfaisants même avec des doses très réduites.

J'ai fait ensuite de nombreuses expériences pendant la 3ème période de ces recherches — période qui va de 1928 à aujourd'hui — en me servant de la voie sous-cutanée et en variant considérablement les doses et les intervalles entr'une injection et l'autre.

Ces cures tellement différentes entr'elles ont toujours donné un grand nombre de guérisons, complètes sans cas de récidives, qui sont fréquentes, mêmes quelques mois après la guérison clinique, lorsqu'on se sert de vaccins spécifiques.

Il est donc possible aujourd'hui d'établir un schéma de traitement que l'on peut appliquer à la grande majorité des cas, et qui donne des résultats très satisfaisants même si la maladie est déjà arrivée a un stade avancé.

Prochainement je publierai un mémoire détaillé des expériences faites depuis 1917 jusqu'à aujourd'hui, en y précisant la technique de la cure de l'isopathinothérapie du Farcin cryptococcique; cette infection est très répandue dans toute la zone de la Méditerranée et très fréquente dans l'Italie Méridionale ou elle cause, chaque année, de graves dommages a l'industrie de l'élevage des chevaux.

PALTRINIERI S. – **La sensibilisatrice antituberculeuse chez les veaux vaccinés par le B. C. G.**

La prémunition antituberculeuse par le bacille bilié de Calmette et Guerin (B. C. G.) a donné lieu à beaucoup de recherches et d'expériences, qui ont eu pour bout particulièrement l'étude de l'hypersensibilité tuberculinique, des modifications hystologiques, hématologiques et humorales qui se verifient dans l'organisme sain qui reçoit ce nouveaux traitement vaccinal.

En Médicine Vétérinaire, où la vaccination selon la méthode de Calmette est largement pratiquée chez les jeunes veaux, l'on a fait des constatations assez intéressantes à propos des réactions hystologiques des tissus et de l'état allergique des soujets vaccinés. Au contraire l'on n'a pas étudié, jusqu'aujourd'hui la réaction humorale qui suit à l'introduction du B. C. G. par voie parenterale.

Nous nous sommes adressés particulièrement à cette importante donnée de l'état immunitaire antituberculeux et nous avons recherché dans le sérum de sang des veaux vaccinés la production eventuelle d'anticorps spécifiques (sensibilisatrice antituberculeuse).

Calmette même, dès 1914, publia des expériences sur le pouvoir de produire anticorps du B. C. G., mais à cette époque le grand savant, dans le cours d'autres expériences, inoculait des doses massives de bacilles biliés dans les veines chez de veaux et de chévaux, pour obténir des sérums très riches en anticorps antituberculeux, Ces bacilles n'avaient pas encore subi le traitement complet d'atténuation graduelle par les passages successifs sur pomme de terre bilié. Les bases des expériences de Calmette s'éloignent donc de nos expériences actuelles soit pour la quantité soit pour la virulence du B. C. G. employé. En effet nos recherches ont été faites sur des veaux vaccinés dans les dix-quinze jours qui suivent leur naissance avec la dose de B. C. G. employé normalement pour la vaccination des veaux.

Pour la réaction de deviation (fixation) du complement, nous avons choisi l'antigène à l'oeuf de Besredka, que nous avons deja employé dans des expériences antérieures [1]. Nous avons examiné jusqu'aujourd'hui N. 20 veaux, faisant partie d'un lot de sujets vacciné par le Prof. Messieri en Prov. de Bologne par injections souscutanées de vaccin Calmette preparé par l'« Istituto Vaccinogeno Antitubercolare di Milano ».

Chez quelque soujet vacciné après l'âge indiqué (10-15 jours après la naissance) avant l'injection du vaccin nous avons toujours contrôlé l'absence de la tuberculose soit par l'épreuve tuberculinique (intradermique) soit par l'épreuve de deviation du complement. Les séroréactions ont été toujours contrôlées sur du serum de veaux sains et du sérum de veaux tuberculeux.

Pour la valutation quantitative des anticorps nous renvoyons à ce que nous avons écrit à propos d une échelle conventionelle de valeurs [1], échelle que nous avons établie sur la base de la quantité de complement (alexine) fixèe; à savoir nous avons donné la valeur de dose « minima » = 2 à la quantité de complement (alexine) qui est contenue dans le premier tube de la réaction. Pour le rapport 2/0,2 (quantités de complement

---

[1] La Nuova Veterinaria, 1930-1931.

et de sérum contenues respectivement dans le premier tube) nous avons une valeur = 10; les rapports suivants sont 3/0,2 4/0,2, 5/0,2, 6/0,2, 7/0,2, et donnent 15, 20, 25, 30, 35 et ainsi de suite. De cette façon pour chaque réaction nous avons une valeur numerique conventionelle par rapport à la teneur du serum en anticorps.

Nos expériences qui seront exposées prochainement en détail nous ont montré jusqu'aujourd'hui:

1) Chez les veaux vaccinés par le B. C. G. que nous avons examinés, nous avons toujours constaté la présence dans le sérum d'anticorps spécifiques par la réaction de déviation du complement (réaction de fixation).

2) Les anticorps sont décelables déjà 8-10 jours après l'injection du 1er vaccin. Leur quantité (variable selon les soujets) n'a jamais touché un taux très elevé (valeur moyen numerique 10-15). Cette quantité tend vers la diminution et disparait le 4ème-5ème-6ème mois après la vaccination.

3) L'on a constaté une augmentation dans la valeur des anticorps après l'injection du 2ème vaccin (pratiquée 6 mois après la première). Cette augmentation peut toucher une valeur moyenne de 20-25. Cette valeur est aussi plus constante, et tout en diminuant dès que l'on s'éloigne du jour de l'injection du 2ème vaccin, ne touche plus le zero.

4) Après la troisième injection, pratiquée 12 mois après la deuxième, l'on a constaté encore une augmentation remarquable des anticorps (valeur moyenne numerique 25-30) sans toucher jamais le taux constaté chez les veaux tuberculeux dans nos experiences antérieures (valeur moyenne 35 et plus).

5) En examinant comparativement la réaction locale au point d'injection avec le résultat de l'examen sérologique il semble y avoir un rapport entre les deux phénomènes. En effet:

a) Chez les veaux qui presentent une réaction vaccinale plus forte avec des nodules qui peuvent toucher la grandeur d'un oeuf de poule, l'on a constaté aussi une valeur plus grande en anticorps.

b) Il parait y avoir une correspondance entre une plus longue durée du nodule et une permanence prolongée des anticorps dans la circulation.

En conclusion nos recherches confirment ce que Calmette ecrit dans son traité: « Le B. C. G. est donc un excellent antigène ». Le B. C. G. introduit dans l'organisme des veaux détermine donc la production d'anticorps (de fixation) identifiables par la même réaction qui decele les anticorps produits par l'inoculation expérimentale de bacilles bovins virulents et par l'infection tuberculeuse naturelle de cette espèce animale.

Clinique Médicale du Royal Institut Supérieur de Médecine Vétérinaire de Bologne.

CONFALONE RAFFAELE – **Recherches expérimentales sur l'influence réciproque de la vaccination anti-typhique et de la vaccination de Jenner.**

Il m'a semblé être intéressant d'étudier expérimentalement les modifications sérologiques qui se manifestent après la vaccination de Jenner faite soit avant, soit en même temps ou après la vaccination anti-typhique; Je pense, en effet que ces études expérimentales peuvent être utiles en rapport avec les vaccinations faites dans l'Armée, où il est souvent nécessaire de faire les vaccinations en même temps, ou bien alternées.

J'ai donc étudié les rapports existant entre la vaccination de Jenner et celle typhique, en observant les effets sur des lapins d'après l'évolution de la pustule (produite par le vaccin) et d'après la quantité des agglutinines anti-typhiques. Ces moyens sont ceux que l'on pratique habituellement, bien qu'ils ne soient pas rigoureusement exacts du point de vue scientifique.

La vaccination de Jenner fut pratiquée de la façon suivante; je rasais le poil du dos de l'animal et je faisais, dans la peau, deux incisions parallèles, à la distance de 4 cm. à peu près, l'une de l'autre; ensuite je passais le vaccin sur l'une des scarifications, en laissant l'autre comme contrôle. La vaccination antityphique fut faite par voie intra-veineuse en inoculant 1 cc. de suspension bactérienne, maintenue pendant une heure au bain-marie à 60°, par kg. de poids, et en répétant ce traitement trois fois, à des intervalles d'une semaine: le pouvoir d'agglutination fut déterminé une semaine après chaque inoculation et ensuite chaque semaine jusqu'à sa disparition.

Chaque lapin était tenu seul dans une cage, était pésé tous les jours et soumis aux observations nécessaires.

J'ai divisé les animaux en six groupes.

1^er^ Groupe: aux deux lapins de ce groupe (contrôle) je ne fis que la vaccination de Jenner: l'éruption due à la vaccination eut un cours régulier et cessa 15 jours après. Aucun dérangement général appréciable ne se manifesta.

2^ème^ Groupe: aux deux lapins de ce groupe (contrôle) je ne fis que la vaccination anti-typhique. Le pouvoir d'agglutination du sérum fut assez prononcé (1: 3500); le poids diminua d'une façon considérable mais augmenta nouvellement et par degrès à mesure que le pouvoir d'agglutination disparaissait.

3^ème^ Groupe: les huit lapins de ce groupe furent soumis, le même jour, à la vaccination de Jenner et à celle anti-typhique. Quatre de ces

animaux moururent, au cours du traitement, par effet des injections: le sérum du sang n'avait aucun pouvoir d'agglutination, et leur poids avait diminué rapidement d'une façon considérable. L'evolution de la pustule due à la vaccination était normale.

Sur les quatre animaux qui survécurent, la pustule se développa normalement, le poids diminua de beaucoup, et la teneur de l'agglutination typhique de leur serum était prequ'insignifiante. Un seul fit exception, pour le quel la teneur de l'agglutination augmenta d'une façon assez considérable mais en suivant une courbe irrégulière.

4ème Groupe: aux quatre lapins de ce groupe on inocula le vaccin de Jenner trois jours avant le commencement de la vaccination anti-typhique. On n'observa aucune diminution remarquable du poids de ces animaux: le cours de l'éruption fut normal: le pouvoir d'agglutination du sérum se manifesta rapidement, mais disparut tout aussi vite après être arrivé à des valeurs égales et même supérieures, à celles des animaux de contrôle.

5ème Groupe: les quatre lapins de ce groupe furent traités avec du vaccin de Jenner 15 jours avant le commencement de la vaccination anti-typhique. L'évolution de la pustule fut normale: la production d'agglutinines antityphiques fut moindre. Le poids diminua, non excessivement, pendant le traitement anti-typhique. Tous les animaux survécurent.

6ème Groupe: le vaccin de Jenner fut inoculé aux quatre lapins de ce groupe une semaine après la dernière iniection anti-typhique. Le poids diminua d'une façon remarquable pendant le traitement anti-typhique et la production des agglutinines arriva à des valeurs égales à celles des lapins de contrôle: l'éruption due au vaccin eut le même cours que celle des contrôles correspondants.

Les faits que nous avons exposés exigent quelques explications. Les expériences faites sur les lapins du troisième groupe sont très importantes car elles prouvent que l'organisme du lapin ne résiste que très rarement aux deux immunisations faites en même temps.

Le sérum des quatre animaux morts précocément n'avait aucun pouvoir agglutinant pour le b. du typhus, bien qu'ils eussent reçu deux ou trois injections de vaccin. Le fait de pratiquer en même temps les deux vaccinations ne modifie donc point, d'une façon sensible, l'évolution de la pustule mais donne lieu, dans l'organisme, à un état d'anergie vers la vaccination anti-typhique. La vaccination de Jenner, en outre, intéresse tout de suite les pouvoirs réactifs de l'organisme, et arrête la réactivité antitoxique, de façon à ce que l'organisme ne réussit pas toujours à vaincre les effets toxiques du vaccin anti-typhique inoculé.

Les phénomènes observés sur les lapins du 4ème groupe semblent être en contradiction avec l'hypothèse que nous venons d'énoncer. Ces animaux ont subit, sans en souffrir, les deux vaccinations: la pustule se développa régulièrement et la production d'agglutinines fut plus prononcée que celle des contrôles: mais le titre d'agglutination, qui pourtant avait gagné son « maximum » immédiatement après la première injection, diminua ensuite beaucoup plus rapidement que celui des contrôles.

La seule différence qui passait entre les animaux de ce groupe et ceux du 3ème était que pour ceux-ci la vaccination anti-typhique avait été commencée le même jour qu'avait été faite l'injection de Jenner, tandis que pour les derniers elle n'avait été faite que trois jours après.

Un laps de temps de trois jours a donc produit une différence très prononcée.

Est-il possible de donner l'explication de ce fait? On peut aussi penser que l'antigène typhique, introduit dans l'organisme trois jours après celui de Jenner, y trouve un terrain plus favorable par rapport aux pouvoirs d'immunisation de l'organisme, que lorsqu'il y est introduit en même temps. Au premier abord ce fait semble plutôt curieux, absurde même: mais il faut se rappeler que nous ne savons rien de ce qui a lieu dans l'organisme pendant les vaccinations, surtout les premiers jours après une vaccination de nature différente: pendant cette période l'organisme est plus sensible que d'ordinaire aux agents d'infections et vers leurs produits.

Les résultats du 5ème groupe sont aussi très intéressants; pour ces animaux la production d'agglutinines fut moindre, comme pour ceux du 3ème groupe: mais tous ont survécu.

La seule explication possible de ce fait est que l'organisme, qui vient de subir le processus d'immunisation de Jenner, se trouve dans des conditions d'anergie relative par rapport a l'introduction d'un nouveau matériel d'immunisation. Le groupe de lapins aux-quels on avait inoculé le vaccin de Jenner après la fin de l'immunisation anti-typhique (6ème groupe) ne laissa faire aucune observation spéciale, car pour ces animaux ont eut un titre de typho-agglutination très prononcé et, ensuite, le cours de l'eruption du vaccin fut régulier: pour ces expériences on a donc tous les facteurs favorables pour que l'immunisation double se produise.

En considérant séparément et tous ensemble les résultats de mes expériences on peut affirmer que la vaccination anti-typhique a une influence plus prononcée que celle de Jenner sur l'organisme et sur l'équilibre normal de ses fonction: on peut le déduire d'après la perte de poids assez considérable.

La vaccination anti-typhique faite avant ou après celle de Jenner,

donne des résultats différents: en commençant par celle-ci on obtient des effets très peu prononcés, et, en certains cas, même mortels.

En pratiquant antécédemment la première de ces deux injections les effets sont plus surs pour les deux vaccinations, et l'on ne rencontre aucun inconvénient.

En considérant ces faits du point de vue pratique, et supposant que pour l'homme les phénomènes aient lieu d'une façon semblable à celle que j'ai observée au laboratoire, il me semble qu'il soit le cas de pratiquer la vaccination anti-typhique avant celle de Jenner.

Conclusions. — *a*) La vaccination anti-typhique faite en même temps que la vaccination de Jenner produit souvent la mort des animaux d'expérience.

b) La vaccination anti-typhique faite trois jours après celle de Jenner, produit la formation d'agglutinines qui, bien qu'elle soit plus rapide et souvent même plus intense que pour les animaux de contrôle, diminue et cesse beaucoup plus rapidement.

c) La vaccination anti-typhique faite quand la pustule du vaccin a disparu ne produit que très peu d'agglutinines et pendant un laps de temps très court.

d) Si la vaccination de Jenner est faite après celle anti-typhique les deux vaccinations n'ont aucune action réciproque.

RÉSUMÉ.

J'ai étudié expérimentalement sur des lapins les modifications sérologiques produites par la vaccination de Jenner faite en même temps ou après celle anti-typhique, en espérant en tirer des conclusions sur l'influence réciproque des deux vaccinations.

J'ai observé que la vaccination anti-typhique, faite en même temps que celle du vaccin de Jenner, produit souvent la mort des animaux d'expérience: la vaccination antityphique faite trois jours après celle de Jenner donne lieu à une production rapide et intense de typho-agglutinines qui s'éteint en peu de temps: la vaccination anti-typhique faite après que la pustule du vaccin a disparu ne produit que très peu d'agglutinines et pour un laps de temps très court. La vaccination de Jenner faite après celle anti-typhique démontre que ces deux traitements n'ont aucune influence réciproque.

Institut d'Hygiène de l'Université Royale de Naples.

PAMPANA EMILIO – **La dissociation microbienne dans le groupe typhus-paratyphus-dysentérie, et dans les „ Brucellae " et l'emploi de la trypaflavine comme son réactif.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

M. M. Alessandrini et Sabatucci (Ann. d'Ig. 1931, XLI, p. 29) viennent de publier une élégante réaction d'agglutination aspécifique, qui se produit sur les émulsions de certains microbes en présence d'une solution de trypaflavine.

J'ai étudié cette réaction sur 67 souches de *Salmonellae* et sur 27 souches de bacilles dysentériques et méta-dysenteriques, et j'ai trouvé que la réaction était parfois positive avec certaines souches d'une espèce ou d'un type bactérien donné, pendant qu'elle était négative avec d'autres souches de la même espèce ou du même type.

L'étude des colonies isolées, provenant de certaines souches, et assujettées à l'agglutination à trypaflavine, a montré qu'en plusieurs cas, une certaine quantité de colonies était agglutinable, tandis que les autres ne l'étaient nullement. Les colonies agglutinables par la trypaflavine montraient les caractéres morphologiques que l'on attribue aujourd'hui à la variante « R ». Les colonies non-agglutinables présentaient au contraire les caractères typiques des colonies « S » du groupe.

Si une souche ne donnait que des colonies « S », la souche n'agglutinait pas sous l'action du réactif (exemple: souche Y Paris). Si la souche ne donnait que des colonies « R » elle était fortement agglutinable par la trypaflavine (exemple: souche Shiga Dopter). Si la souche montrait, sur plaque de gélose, un pourcentage de colonies « R » plus ou moins élevé, son comportement vis-à-vis de la trypaflavine y était parallèle.

J'ai alors recherché si, en partant de souches complètement non agglutinables par la trypaflavine, il me fût possible d'obtenir une variante « R »; et si cette variante se montrât agglutinable.

En ces expériences je suis parti des souches suivantes: *B. paratyphosus A* (Paris); *B. paratyphosus B* (Lister), *B. suipestifer* (W-Européen ou Kunzendorf); *B. dysentérique Y* (Rome); *B. dysentérique Y* (Paris); *Brucella melitensis* (2); *Br. abortus* (Stazzi 75); *Br. abortus* (K. K.).

Par le moyen le plus simple que l'on connait pour exciter la dissociation microbienne, c'est-à-dire par le passage journalier, ou du moins très fréquent, des cultures en bouillon, je suis arrivé bientôt à obtenir des cultures liquides qui, au lieu d'être uniformément troubles comme d'ordinaire, montraient un développement flocculaire, parfois avec un voile à la surface, qui se fragmentait aisément en floccules, et un milieu

limpide. En ensemençant sur plaque ce bouillon, les colonies qui se formaient étaient, en un pourcentage bien élevé, parfois même au 100%, agglutinables à la trypaflavine; et elles montraient clairement, dans le cas des *Salmonellae* et des b. dysentériques, les caractères des colonies « R ». Les tubes de gélose, ensemencés avec les colonies « R » donnaient un enduit microbien ,dont l'émulsion était agglutinable par la trypaflavine.

Cette substance peut donc être considérée comme un réactif de la variante « R » des microbes étudiés. Et puisque, en employant la technique d'agglutination sur lamelle (« *Dropagglutination* ») c'est-à-dire, en deposant une goutte de solution de trypaflavine sur une lamelle, et en y emulsionnant une anse de culture, on peut lire la réaction au bout de quelques secondes, et à l'oeil nu, on s'aperçoit facilement que ce réactif est d'une praticité extraordinaire pour reconnâitre la variante « R ».

Par les mêmes moyens employés pour obtenir la variante « R » des paratyphiques et des dysentériques, on a aussi obtenu, des trois souches de *Brucella*, une variante qui se développait d'une manière flocculaire dans les milieux liquides, qui était agglutinable par la trypaflavine, qui pouvait même devenir instable dans la solution physiologique, et qui, sur plaque de gélose, donnait une culture plus jaunâtre et plus opaque que la culture du point de départ: c'est-à-dire, on avait aussi obtenu la variante « R » des trois souches de *Brucella*. Mais, si à ces caracteres que nous venons de décrire, on ajoute aussi que les variantes obtenues étaient agglutinables par l'action de la chaleur (Thermoagglutination de Burnet), à différence des souches originelles, et qu'elles étaient aussi agglutinables par le sérum *anti-paramelitensis*, on devrait conclure que le *paramelitensis* semble n'être autre chose que la variante « R », soit de la *Br. melitensis*, soit de la *Br. abortus*.

Institut d'Hygiène de la R. Université de Rome.

SABATUCCI M. – **Phenomènes de dissociation microbienne dans les staphylococques, révélables par Tripaflavine.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

En collaboration avec M. A. Alessandrini, j'ai tout dernièrement démontré (Ann. di Igiene, 1931, XLI, pag. 21) que la tripaflavine, qui est une couleur dont on se sert beaucoup en thérapie, exerce une action agglutinante trés prononcée sur plusieurs bactéries; on peut différencier de cette façon des espèces microbiennes très ressemblantes entr'elles, comme la *Br. Melitensis*, et la *Br. Abvitus*, de la *Br. Paramelitensis*.

En se servant de cette agglutination aspécifique pour l'étude des microbes du groupe typhus-paratyphus-dyssentérie et de leur variante *R* (= rough = rude) et *S* (= smooth = lisse), M. E. Pampana (Boll. Sez. Ital. della Soc. Internazionale di Microbiologia, Avril 1931) arrive à conclure que la Tripaflavine est un véritable réactif des variantes *R* et des souches qui leur sont semblables, bien qu'elles n'en aient pas encore pris les caractères morphologiques. A propos des *Brucellae* cet A. affirme que la *Br. Paramelitensis* n'est rien autre que la variante *R* de la *Br. Abortus* et de la *Br. Melitensis*. J'ai appliqué l'agglutination par la tripaflavine à l'étude des staphylococques, en espérant de pouvoir observer les phénomènes de dissociation bactérienne que cette nuovelle méthode permet d'étudier et en l'appliquant à une espèce de microbes, pour lesquels l'absence de caractères morphologiques caractéristiques entre une colonie et l'autre n'en avait jamais laissé observer la présence. En soumettant à l'action de la tripaflavine un grand nombre de colonies de staphylocoques de collection, isolées sur agar, j'ai pu observer que la grande majorité est trés agglutinable et qui il est toujours possible de mettre en évidence celles qui ne le sont pas du tout à côté d'autres qui ne le sont qu'en partie: ce fait a lieu de façons différentes selon les souches. Pour une souche (Staphylococcus aureus *B*, de l'acné) la proportion de colonies non agglutinables a été du 50%. Bien que les caractères morphologiques permettant de distinguer une colonie de l'autre fassent absolument défaut (caractères macroscopiques, microscopiques et de coloration) je continuerai à les définir par les symbôles *R* et *S* afin de ne donner lieu à aucune confusion, et aussi pour la raison qu'un grand nombre de variantes dont il est ici question correspondent aux variantes *R* et *S* des autres microbes. En conclusion, jé définirai par R les souches agglutinables sous l'action de la tripaflavine, et par *S* celles non agglutinables. L'agglutination a été déterminée par la preuve de la goutte sur verre (drop-agglutination), méthode qui est très utile surtout pour l'examen des colonies sur plaques: on peut la répéter aussi dans des tubes. bien que de cette façon l'expérience soit moins sensible. En pratiquant un grand nombre d'isolements successifs, j'ai pu isoler les souches de la variante *R* et celles de la variante *S* parfaitement pures. L'étude de ces souches m'a permis de faire de nombreuses observations que je rendrai plus complétes et que j'exposerai en détail dans une prochaine communication. Je me bornerai ici à relater et à résumer les faits les plus importants que j'ai observé.

1° Dans les cultures de staphylocoques c'est toujours la variante *R* qui prévaut; on peut la considerer comme la variante normale.

2° La forme *S*, qu'on ne peut observer que difficilement, est très difficile à isoler et à maintenir absolument pure, car, si l'on n'a soin de

prendre des précautions particulières, elle tend spontanément à se transformer dans la forme R. Mais on peut, toutefois, obtenir et conserver les souches *S* parfaitement pures et qui possèdent une réaction négative vers l'agglutination due à la tripaflavine et vers l'agglutination avec du $CuSO_4$. Cette substance est très sensible et rélève avec précision les moindres tendances vers la variante *R*.

3° La cultivation sur des terrains le plus secs possible a constitué une des précautions les plus necessaires pour conserver la variante *S*.

4° Il est trés difficile, sinon impossible, de transformer la variante *R* dans la variante *S*, tandis que la transformation inverse est facile et simple à réaliser par quelques passages successifs sur des terrains liquides. En continuant ces passages on peut augmenter fortement les caractéristiques de la *R*, jusqu'à obtenir un développement granulaire présentant une pellicule à la surface. Mais pour ces colonies, en répétant les cultures sur agar, on ne peut avoir aucun caractère morphologique si prononcé qui nous permette de les différencier des colonies formées par des souches de *S*.

5° La tripaflavine est le réactif caractéristique pour ces deux variantes qui peuvent être ainsi différenciées. En se servant d'un réactif moins sensible, c'est à dire, par exemple d'une solution hypertonique d'*NaCl*, un petit nombre seulement de souches agglutinables par la tripaflavine, se laisse agglutiner: ce sont celles qui démontrent au plus haut degré les caractéristiques de *R*. Avec. un réactif très sensibles, $CuSO_4$ par exemple, certaines souches, qui ne sont pas agglutinables par la tripaflavine, subissent l'agglutination; ce sont celles qui ne possèdent point les caractères de *S* parfaitement purs.

6° Les deux variantes ne sont ni thermo-agglutinables, ni auto-agglutinables.

7° Il n'y a aucune relation entre les variantes et la pigmentation.

8° Le deux variantes (produites, naturellement, par la même souche) ne présentent aucune différence en fait de coagulation du lait et de récoagulation du sang au citrate (Darângi).

9° Les deux variantes se différencient surtout pour les raisons suivantes.

a) *Culture sur gelatine.* — La variante *S* possède une activité protéolytique très prononcée et est absolument aérobie (le développement n'a lieu que pour le premier centimètre et la fluidification est complète; pour les couches plus profondes le développement est moins marqué et il n'y a aucune trace de fluidification), tandis que pour la variante *R* l'activité protéolytique est moins prononcée et elle supporte mieux l'anaéro-

biose (fluidification à cône présentant un développement assez prononcé; la fluidification s'étend aussi au couches profondes).

b) *Agglutination produite par les sérums normaux.* — La variante *R* peut être agglutinée par les sérums normaux d'homme et de lapin, même pour des teneurs assez élevées, 1%100-1%250: la variante *S* est presque négative à l'action de ces sérums.

c) *Production d'agglutinines.* — En préparant, avec deux souches, les antisérums correspondants, on observe que la variante *S* possède un pouvoir antigène très prononcé, en produisant des agglutinines à titre élevé vers la même variante *S* et en augmentant de beaucoup les agglutinines vers la variante *R*, agglutinines qui se trouvent déjà dans le sérum normal. La variante *R* a un pouvoir antigène plutôt faible, elle ne produit point d'agglutinines anti- *S*, et n'augmente pas considérablement les agglutinines naturelles vers elle même.

d) *Virulence.* — Les premières expériences sur des lapins prouvent que la variante *S* est beaucoup plus virulente que celle *R*. J'ai l'intention de continuer l'étude de ces deux variantes, surtout en rapport avec l'immunité et la vaccination.

Institut d'Hygiène de l'Université Royale de Rome.

SEPPILLI A. – **Influence du calcium sur la production des pigments bactériens.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

Les résultats expérimentaux qui font l'objet de ce mémoire, constituent une partie des recherches, beaucoup plus vastes, sur les pigments bactériens en général, que j'espére conclure eu recueillant toute la bibliographie — très abondante — qui existe sur cette question et qui n'est touchée qu'en abrégé dans les *Traités*, même les plus lus.

Je ne désire présenter, ici, que quelques résultats que j'ai obtenus en variant grossièrement le contenu en sels de calcium des terrains de culture, en relation avec la formation du pigment que produisent plusieurs espèces bactériennes chromogènes. En bibliographie on ne trouve, me semble-t-il, sur ce sujet, que le travail de M. Paul Bordet. Cet. A., tout dernièrement, en se servant d'une technique très simple, a étudié les conséquences produites par l'élimination de la quantité de calcium habituellement présente dans les terrains de culture, sur les caractères morphologiques et biologiques des bactéries. M. Bordet a fait remarquer, que le B.

prodigieux, entr'autres, se développe beaucoup plus pigmenté sur les terrains pauvres en calcium (couleur rouge éclatante) tandis que sur les terrains où cet élément abonde, les colonies se développent avec les mêmes caractères morphologiques mais presqu'incolores et avec une nuance très différente (rose-orange).

Ayant à sa disposition plusieurs souches de germes chromogènes, pathogènes et non-pathogènes, isolées sur les matériaux les plus différents, et toutes assez recentes, (1-2 ans) j'ai voulu étudier à fond ce phénomène.

La technique que j'ai suivie est celle que M. Bordet avait proposée, avec des variations insignifiantes. Deux quantités egales de bouillon (de la même partie et préparées avec de l'eau distillée) sont traitées, l'une avec une solution d'oxalate de sodium au 2% — dans la proportion d'un dixiéme du volume — et l'autre avec la même quantité d'eau distillée). En se servant de ces bouillons on prépare de l'agar au 2%, on le filtre soigneusement (sur de l'ouate et sur du papier) et on le verse dans les tubes.

Avant de faire solidifier (à bec de clarinet), on ajoute 4 gouttes de solution de chlorure de calcium à l'1% dans les tubes préparés sans oxalate (contenant à peu prés 10 cc. d'agar). De cette façon les tubes de la première série contiennent le 2‰ d'oxalate de sodium, tandis que dans les autres il ya un petit excès de chlorure de calcium.

Les souches dont je me suis servi, — elles m'ont été toutes fournies par l'Institut d'Hygiène de Padoue — sont les suivantes:

Staphylococcus aureus, *staphylococcus citreus*, *staphylococcus albus*, *B. prodigiosum*, *B. pyocyaneum*, *B. Luteum*, *sarcina alba*, *sarcina lutea*, *sarcina fava*, *sarcina aurantiaca*, *sarcina rosea*, *sarcina eritromyxa*, *sarcina oliva* (cette espèce est très rare, et a été isolée d'un echantillon de lait; après plusieurs transplantations elle n'a plus été capable de produire le pigment caractéristique de couleur olive); enfin un Bacille chromogène isolé d'un échantillon d'eau potable. Ce germe n'a pas encore été identifié. Les transplantation furent faites exactement tous les 20 jours. A' peine transplantées, les cultures étaient maintenues dans un thermostate, à 37°, pendant 24 heures: ensuite on les laissait à la température de l'ambiant (15°-20°).

On faisait les lectures de cinq à vingt jours après les transplantations. Ces transplantations furent répétées en séries homologues, c'est à dire toujours avec de l'agar du même type (soit à l'oxalate, soit au chlorure de calcium) depuis la première jusqu'à la dernière.

Les transplantations de chaque culture nous montrent que les résultats ne changent pas beaucoup à cause de ces passages; les phénomènes que l'on pouvait observer au premier ou au deuxième passage se sont répétés, presque sans variations, pour tous les autres.

Les cultures décrites ci-dessous montrent les résultats du traitement mieux que toute description. Les germes que j'ai étudiés peuvent être divisés en deux groupes.

1° Ce premier groupe comprend presque toutes les souches qui ont servi aux expériences: on a pu, de cette façon, confirmer les faits observés par M. Bordet, c'est à dire que la présence de fortes quantités de calcium empêche la production du pigment; dans les terrains privés de calcium par le traitement à l'oxalate de sodium, le pigment se trouve en grande quantité.

2° Le deuxième groupe qui n'est représenté que par le staphylocoques « aureus » et par le B. pyocyaneum se comporte d'une façon complétement différente. Le *pyocyaneum*, surtout ne produit son pigment fluorescent (bactério-fluoréscine) que dans les terrains à l'oxalate, et n'en produit du tout dans ceux au calcium. (Je n'ai pu me servir d'un *B. pyocyaneum* isolé récemment pour étudier le comportement de la pyocyanine dans les mêmes conditions).

La différence de comportement dans les deux conditions d'expérience n'est pas si marquée pour toutes les espèces. Elle ne se manifeste que très peu distinctement pour la « Sarcina aurantiaca » et pour la « S. eritromyxa », tandis qu'elle arrive au « maximum » pour la « Sarcina rosea » et pour le *B. pyocyaneum*. La « Sarcina oliva » n'a plus produit son pigment caractéristique, même pas sur les terreins, à l'oxalate: cette espèce avait donné lieu à la coloration particulière lors de ses premiers passages — à peine isolée — sur l'agar habituel. Mais il existe, toute fois une différence, entre les deux séries de cultures: en effet celles faites sur les terrains à l'oxalate ont une couleur ivoire foncée, tandis que celles sur les terrains au calcium sont parfaitement blanches, comme les cultures de la « Sarcina alba ». On n'a observé aucune différence entre les cultures parallèles des espèces blanches (Staphylococcus, Sarcina).

Je ne rappellerai point ici les autres différences que l'on peut observer dans les cultures parallèles, car elles n'ont aucun rapport avec le sujet dont nous parlons ici. Il faut, en tous cas, remarquer que le germe ne paraît point souffrir, ni morphologiquement ni pour ce qui en est de l'aspect macroscopique des cultures; leur développement a toujours été très abondant, soit dans les tubes riches en calcium soit dans ceux où il n'y en avait pas. En tous cas l'avantage est du côté des cultures à l'oxalate dont le développement a toujours été plus épais, plus crémeux et plus abondant que sur les cultures au calcium.

J'ai aussi fait des expériences en gardant les cultures à l'obscurité ou en pleine lumière diffuse; ces conditions n'ont produit aucune différence dans la production du pigment.

J'ai constaté, en outre, qu'excepté le staphylocoque *aureus* et le *pyocyaneum* — qui se pigmentent aussi, et peut-être même mieux qu'à la témpérature de l'ambiant, lorsqu'on les maintient au thermostate — les autres chromogènes non pathogènes et habitués à vivre dans l'ambiant extérieur ne se pigmentent pas du tout ou bien seulement d'une façon moindre lorsqu'ils sont tenus à une température supérieure, bien que leur développement soit toujours très abondant. La température de 20° est la meilleure pour le développement du pigment.

La production du pigment ne peut pas en tous cas nous donner l'explication du mécanisme de l'action du calcium: il sera possible d'y arriver en faisant des recherches sur la signification biologique des pigment bactériens, en général, pigments dont la constitution chimique est très différente et corresponde sûrement à des fonctions biologiques particulières dans les différents groupes de germes.

Ce qui est frappant, parmi toutes ces expériences, c'est le fait que les deux seuls germes de ma collection, généralement pathogènes, se sont comportés d'une façon complétement différente. Mais en laissant de côté leur pathogénicité — plutôt relative — pour les animaux des espèces supérieures, il me semble qu'il faille tenir compte du fait que ce sont les seuls germes — parmi ceux que l'on a étudiés — capables de pigmenter parfaitement à la température de 37°, tandis que tous les autres ont une limite supérieure de température considérablement plus basse.

Enfin j'ajouterai que je suis en train de faire des recherches sur la virulence des deux souches, soit dans le série pigmentée, sont dans celle qui ne l'est pas.

MUGGIA A. – **Recherches et observations sur la cultivabilité du virus de la tuberculose dans le sang.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

Tout le monde aujourd'hui, met, hors de doute, la présence dans le sang circulant d'un individu atteint de tuberculose, de bactéries du tubercule vivantes et virulentes en de telles quantités que l'on peut en révéler la présence en les cultivant sur des terrains particuliers.

La positivité de ces expériences varie entre des limites assez vastes. D'après les recherches de le prof. M. Azzi et d'autres élèves de son école il semble que ce phénomène doit être considéré comme exceptionnel pendant le cours complet du processus tuberculeux, soit pour l'homme comme pour les animaux infectés expérimentalement.

M. Azzi, par exemple, en faisant plusieurs essais biologiques et cultu-

raux sur du sang de cobayes tuberculeuses obt'nt, pendant le cours de l'infection, quatre cas biologiquement et culturalement positifs sur 57 cas examinés; il n'obtint en outre, que deux cas biologiquement positifs.

Liebermeister, *Griffon*, *Philibert*, *Lippmann*, etc. ont obtenu à peu près le 30% de résultats positifs avec du sang humain de sujets atteints de tuberculose pulmonaire. En examinant la bibliographie très abondante qui existe sur cette question, on peut admettre que la microbactérie du tubercule n'est point présente d'une façon constante, dans le sang d'un individu tuberculeux mais qu'elle y apparait périodiquement. Ce phénomène a lieu chez l'homme comme chez les animaux, et même pour les espèces, comme les cobayes, pour les quelles l'infection tuberculeuse a presque toujours un cours progressif plutôt rapide.

Nous ne discuterons point ici la signification de l'apparition périodique de la microbactérie du tubercule dans le sang circulant: nous reppellerons seulement que plusieurs AA. pensent que ces m. b. sont atténuées et non dangereuses, et que, d'autre part, nous possédons un grand nombre d'observations qui indiquent que la variabilité des pouvoirs de défense du sang de l'homme et de celui des animaux atteints de tuberculose est très grande. Au Congrès de Pédiatrie tenu au mois d'août dernier à Stockholm, une communication a tout particulièrement attiré l'attention et la curiosité du public à cause de la renommée de son Auteur et de l'actualité de l'argument. J'entends parler de la communication de M. Löwenstein, Directeur de la section de la tuberculose de l'Institut Sérothérapique de l'État, de Vienne, dont le thème était « *Die Reinkultur des Tuberkelbacillus aus dem stromenden blute* » qui nous a appris qu'en se servant du terrain de culture au rouge-congo, de Löwenstein lui-même, l'O. a réussi a isoler du sang, avec la plus grande facilité et pour des maladies les plus différentes, la microbactérie du tubercule. Pour 140 cas de tuberculose pulmonaire on eut 54 résultats positifs; sur 28 cas de tuberculose du larynx 18 cas positifs, 13 sur 22 cas de tuberculose rénale, 9 sur 18 cas de tuberculose des os, 3 sur 4 cas de tuberculose oculaire. Sur 51 cas de différentes formes de tuberculose cutanée, pour les quels on fit 92 examens, les résultats positifs ont été 23.

Mais ce qui étonna vraiment tout le monde ce furent les résultats obtenus pour les cas de rhumatisme articulaire aigu que l'A. a etudié en collaboration avec le prof. Reitter, directeur de l'Hôpital de la Ville de Vienne. Sur 21 cas de rhumathisme articulaire aigu qui ont été examinés, et dont quelques uns avec endocardite, Löwenstein a obtenu 1 fois des cultures pures de la microbactérie du sang. D'après ces résultats il m'a semblé intéressant d'essayer de faire des cultures du sang, comme les avait faites l'A., pour différentes maladies de nature tuberculeuse et pour les cas de rhumatisme articulaire aigu: j'ai donc

suivi systématiquement la méthode proposée par Löwenstein. Les cas que j'ai examinés ont été au nombre de 9: vu que les résultats ont été constamment les mêmes il sera bon de spécifier que cinq sujets souffraient de rhumatisme articulaire aigu, et quatre de tuberculose pulmonaire avec expectoration positive. Pour un de ces cas on a essayé de faire la culture en se servant du sang du placenta. J'ai fait plusieurs cultures car j'ai voulu, de cette façon. éviter l'inconvénient de la méthode de Löwenstein, c'est à dire qu'avec peu da sang on a une masse pâteuse trés abondante pour la quelle il est nécessaire d'avoir de grandes surfaces de culture.

Mes résultats ont été généralement négatifs. J'ai aussi fait des expériences comparatives avec d'autres terrains (Petroff, Petragnani) pour me rendre compte de la qualité du terrain de Löwenstein par rapport à la microbactérie du tubercule, à sa transplantation et à son isolement, et je n'ai pas remarqué que ce terrain posséde les propriétés particulières qui le distinguent des autres terrains dont il a été parlé plus haut.

CASAGRANDI O. – **Nouvelles recherches sur la maturation des ultravirus dans l'ambiant.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

Les recherches que l'A. a faites il y a quelque temps sur les phénomènes qu'on observe sur les amibes inoculées avec différentes bactéries, ont été continuées sur une amibe de grandes dimensions appelée — par l'A. même — *Magnamoeba pluriplanata*, qui ressemble beaucoup à la grande amibe, d'eau salée que Schaeffer a étudiée il y a quelque temps.

Il a été ainsi possible d'observer, en faisant des expériences avec le bacille de Eberth, que ce sont surtout certaines colonies bactériennes qui présentent des germes des quels ont peut obtenir l'ultravirus avec la digestion amibienne.

En se basant sur cette observation l'A. a pris en considération des recherches analogues faites autrefois sur des insects — les punaies — et est arrivé aux mêmes conclusions. En outre il confirme ces observations en étudiant la façon dont se comportent les mouches par rapport au transport du virus; ce fait a sans doute une grande importance, en rapport, peut-être, aussi avec les saisons. Plusieurs essais expérimentaux faits sur des papadaccis confirmeraient encore cette hypothèse. Le phénomène de la maturation des virus bactériens et spécialement du virus typhique dans les amibes pourrait aussi se produire sous d'autres condi-

tions biologiques; particuliérement dans certaines espéces d'insectes; le mécanisme de cette transformation est encore obscur et devra être étudié; en tous cas il permettra de mettre en évidence les phases invisibles et filtrables de la vie des germes, phases que l'on ne peut méconnaître. Le mécanisme serait produit par des formes de bacilles particuliers capables de donner lieu à des formations coloniales spéciales. L'A. a donc essayé de séparer ces formes en faisant des cultures avec des matériaux poreux qui fonctionnent par adsorption, et en se servant du sang de malades et d'animaux infectés. Il a été mis en évidence, de cette façon, que le bacille de Eberth, sur des terrains absolument stériles et après une longue période d'acultivabilité, peut nouvellement être cultivé plus ou moins bien et l'on peut obtenir de nouveau des formes visibles; il fait en tous cas partir des formes de bactéries qui donnent lieu à certaines cultures particulières. On a ainsi confirmé, par ces recherches, l'existance d'un stade de maturation du virus qui a lieu dans l'ambiant en relation avec différents facteurs biologiques et vivants et en relation avec le terrain de culture auquel il faut attribuer une fonction épidémiologique de la plus haute importance.

CAPOCACCIA M. – **Sur l'importance du facteur dose pour la détermination des réactions locales et générales produites par les bacilles de la tuberculose morts.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

Parmi toutes les recherches dont on peut se servir pour étudier le problème [1], déjà ancien, des réaction histogénétiques, des réactions générales, et du mouvement immunitaire, produits par l'inoculation de bacilles tuberculeux morts, j'ai choisi celles qui résultent de l'étude du facteur dose des corps bacillaires inoculés de différentes façons. Ces expériences ont été laissées généralement de côté. J'ai donc inoculé à des cobayes et à des lapins des quantités variables de germes tués en les chauffant, et suspendus dans de la solution physiologique, de façon le plus possible homogène.

Les infections ont été faites par voie intra-musculaire, intra-veineuse, intra-péritonéale, et intra-cardiaque. On a aussi répété les mêmes expériences sur des animaux colorés auparavant par des injections vi-

---

[1] Il rappellerai les recherches de MM. Maffucci, Prudden et Hodenpyl, Straus et Gamaleja, Krompecher, Gaucher et Ledoux Lebard, Vissmann, Kostenitsch, Engelhardt et Kleber, Baumgarten, Dold, Lange, Freund et Jochimsen Vaudremer, Petroff et Stewart, Soper et Dworski, etc.

tales de trypanblau: à d'autres animaux, enfin, j'ai inoculé le trypanblau aprés l'inoculation des germes.

Selon leur quantité et selon la voie choisie pour l'inoculation, les bacilles tuberculeux tués provoquaient la mort des cobayes et des lapins dans un laps de temps variable de 2 jours à 3 et même à 6 mois.

Les cobayes sont plus sensibles des lapins. En employant les mêmes doses, les animaux traités par voie intra-musculaire meurent avant ceux inoculés par voie intra-péritonéale et par voie intra-trachéale. Tous les animaux, lorsqu'ils sont traités par voie intra-trachéale supportent des quantités de germes 10 fois supérieures à celles qui les tuent en peu de jours si on les traite par voie intra-veineuse ou par voie intra-musculaire.

Dans les animaux qui ont succombé à la suite d'une injection de ½ ctgr. de bacilles tués par la chaleur, on a pu observer des dégénérations du foie, des reins, et de la rate. Pour le foie et les reins il est question de dégénération grasse, pour la rate d'atrophie sclérotique. Chez les animaux qui ont subi la coloration vitale on observe des altérations profondes des cellules de l'appareil réticulum-endothélial.

Lorsque la coloration est pratiquée avant l'inoculation des germes et en traitant les cobayes avec des doses de bacilles supérieures à 1 mmg., on observe que la protoplasma des cellules qui ont subi la coloration vitale se défait, et la granulation de protoplasma se répand dans l'ambiant voisin.

Si, au contraire, on injecte les germes avant de faire la coloration, elle résulte beaucoup moins évidente et le protoplasma des cellules du système se colore de façon différente: les granulations ne se déposent pas et ont une coloration diffuse. Il est connu — comme mes recherches l'ont démontré — que ces phénoménes sont produits par des faits dégénératifs du protoplasma des cellules.

Chez les animaux auxquels on a inoculé par voie intra-veineuse ou par voie intra-musculaire une fraction de mmg. et même 1 mm.g de bacilles on n'observe aucune altération du S. R. E. Même en inoculant de très fortes doses par voie intra-trachéale le S. R. E. ne subit aucune altération. En ce cas les lésions histologiques que l'on sait, ne se produisent que sur le poumon. On n'a donc aucune lésion aux autres organes, en inoculant de fortes dose par voie intra-trachéale; les poumons localisent les effets des toxines tuberculeuses.

Les actions locales de bacilles morts sont très bien connues. On sait qu'ils produisent des réactions aux tissus très semblables à celles dues aux bacilles vivants, en exceptant la migration à travers les voies lymphatiques et — comme le pensent la plus grande partie des AA. — la caséose.

Mes observations me permettent en tous cas d'affirmer que le probléme — si discuté — de l'existance d'un essudat leucocytaire produit par introduction du bacille de Koch dans les tissus, se fonde sur le facteur dose, qu'on a laissé trop souvent de côté même pour ces recherches. Si l'on injecte, par voie intra-musculaire des doses massives de germes on observe, en premier lieu, un essudat leucocytaire très abondant qui produit un petit abcès qui se conserve jusqu'à la mort de l'animal.

Des doses d'1 mmg. donnent lieu au même essudat leucocytaire, mais peu de jours aprés il est substitué par la prolifération histiocytaire — qui est bien connue — avec formation de cellules épithélioides et, en certains cas, de cellules géantes. L'essudat leucocytaire devient presque insignifiant lorsqu'on injecte des doses de germes inférieures à 1 mmg.

L'inoculation par voie intra-veineuse, qui permet une diffusion plus grave au matériel bacillaire, produit toujours des réactions locales du type des granulomes purs.

Les bacilles sont colorables pendant 10 ou 15 jours dans le pus des abcés et ils sont visibles même pendant 45 jours, soit dans la forme de petits bâtons, soit dans la forme granulaire dans les petits granulomes.

D'après mes observations les tubercules de bacilles morts, ont toujours une tendance à la sclérose; je n'ai jamais observé des dégénérations caséuses. La coloration vitale nous montre que le connectif a surtout une influence histiocytaire sur la constitution du petit granulome et que les histiocytes se transforment en fibroblastes lorsqu'a lieu le processus de sclérose.

D'après ces observations nous pouvons faire plusieurs considérations ayant un caractère général.

Avant tout il est important de rappeler que les corps bacillaires se fixent pendant longtemps dans les tissus quand on inocule les germes à des doses suffisantes (c'est à dire lorsqu'on injecte les petites doses nécessaires pour les vaccinations).

MM. Ciuca, Francke et Vitner-Rosenthal [1] ont démontré, par un travail fait à l'Ecole d'Hygiène de la Faculté de Médecine de Jassy, que 65 jours après la vaccination avec des bacilles vivants et atténués par la méthode Calmette, on ne trouve plus aucune trace de germes dans les foyers ganglionnaires sclérotiques qui témoignent de la petite infection précédente. En traitant des cobaye avec ces ganglions triturés, 65 jours après, il ne se produit plus aucune lésion. Cette observation qui démontre que la vaccination avec des bacilles vivants et atténués (B.C.G.) est sans danger, détruit à la base la théorie sur laquelle se fonde la vaccination avec des bacilles vivants.

---

[1] Annales de l'Institut Pasteur, 1929, pag. 168.

S'il est vrai que cette vaccination a sa raison d'être dans l'hypothèse que la présence et la vitalité de l'antigène dans un point quelconque de l'organisme sont indispensables pour soutenir et conserver avec succès l'immunité anti-tuberculeuse, on peut se demander de quelle façon ce fait peut se produire, vu que 65 jours après l'inoculation on ne trouve plus aucune trace de germes dans l'organisme du sujet vacciné.

En lisant la publication des AA. que nous avons rappelés plus haut, on ne peut se rendre compte de l'identité des lésions produites par le B. C. G. et de celles produites par l'inoculation des bacilles morts.

A propos de la possibilité, encore si peu connue, de pouvoir produire un état d'immunité dans les animaux, en se servant de bacilles mort, mes recherches m'autorisent à me valoir de l'hypothèse énoncée avec tant d'autorité par Maragliano à Rome au cours d'une leçon à l'Ecole de perfectionnement de la tuberculose. Les résultats négatifs que beaucoup d'AA. ont obtenus et qui les ont portés à nier le pouvoir immunisant des bacilles morts, sont dus à l'emploi de doses massives de germes. L'immunologie a, comme loi fondamentale, que seulement de très petites doses d'antigènes peuvent donner lieu à un mouvement d'immunisation: d'après M. Vernoni de très petites doses d'antigène sont infiniment plus actives que les doses moyennes et que celles fortes. Il ne faut pas oublier que tous les antigènes sont des protéines hétérogènes, c'est à dire qu'ils sont des poisons très énergiques pour les organismes animaux. Ce poison, lorsqu'il est inoculé dans une certaine quantité, paralise les organes qui produisent les anticorps et les substances défensives en général.

Quelle que soit l'importance qu'on donne à la doctrine de la génèse réticulum-endothéliale des anticorps, une chose est certaine et c'est que ce système joue un rôle trés important dans le mouvement de défense des tissus et dans celui local et a une influence sur ce qu'on appelle l'immunité humorale. Mes recherches ont démontré que ce système est trés sensible à des doses de germes même très reduites. Il faut, en consequence, se rappeler que lorsqu'on fait des expériences avec un antigène toxique comme l'est le bacille tuberculeux il est indispensable d'établir exactement quelle est la dose nécessaire pour provoquer la réaction immunitaire et quelle est la dose toxique et paralisante de cette fonction. Il est bon d'insister sur ce fait, car même les AA. les plus récents, Dold par exemple, qui s'est servi de doses massives de germes, nient la possibilité d'immuniser les cobayes avec des bacilles morts (« Deutsche med. Wochenschrift », 1926, pag. 12), tandis que Vaudremer, (« Rev. Tub. t. XII », 1926, pag. 464) Petroff et Stewart (« Journ. of Immunol. » t. X, 1925, pag. 677); qui se sont servis de doses très petites, affirment le contraire.

L'observation que les réactions locales des tissus sont sujettes à des variations de spécificité sert à confirmer d'une façon indirecte ces

affirmations: ces variations sont en rapport avec le facteur dose: en effet lorsqu'on inocule des doses plutôt fortes on a des réactions leucocytaires non spécifiques, tandis que de petites doses produisent des réactions granulomateuses spécifiques. En se basant sur ces observations qui reportent à leur origine un grand nombre d'études immunologiques et qui confirment les bases théoriques de la vaccination avec les bacilles morts, on peut interpréter les résultats si différents obtenus par les AA., En suivant d'une façon rigoureuse quelques lois fondamentales il est possible de trouver les règles constantes de l'immunisation aussi pour les cobayes et pour les lapins, qui sont les espèces animales dont on a cru ne pas pouvoir se servir.

FAVERO E. – **Recherches sur l'isolement cultural du bacille de Koch dans le sang des tuberculeux.**

(Communication au IIIème Congrès de Microbiologie de Milan).

On a démontré que les bacilles du tubercule sont présents, par intermittance, dans le sang des individus frappés de tuberculose. Les relations existantes entre ce fait et la propagation de l'infection dans l'organisme même ne peuvent être méconnues: mais on recontre de sériculses difficultés lorsq'on tâche de mettre ce phenomène en évidence. On a fait de nombreuses recherches sur cette question, et on a adopté enfin, comme méthode définitive de recherche, la preuve biologique sur les cobayes. En examinant tout le matériel, très abondant, fourni par ces recherches, on peut en déduire que pour un petit nombre de cas il est possible de démontrer la présence des microbactéries du tubercule vivantes et virulentes. La conclusion est qu'il est question d'une preuve non définitive, et inconstante, qui dépend surtout des altérations anatomiques et pathologiques produites par l'évolution du processus morbide (Azzi, Verdina). Tout dernièrement, en se servant de méthodes perfectionnées et en appliquant systématiquement la recherche culturale (Petroff, Petragnani, Hohn) le problème de la bacillémie a nouvellement été étudié par plusieurs AA., et M. Löwenstein a proposé un terrain spécial, beaucoup plus éléctif et beaucoup plus sensible. Ce terrain de culture est prépäré avec des oeufs et de la farine de pommes de terre bien mêlés, auxquels on ajoute le 0,4% de monophoshate de potassium, le 0,04% de sulphate de magnésium, le 0,1% de citrate de magnésium, le 0,6% d'asparagine, le 2% de glycérine, et enfin le 2% d'une solution de rouge congo. On le fait solidifier, comme les autres terrains à l'oeuf, dans des éprouvettes.

Pour isoler le b. en culture pure, on prélève 10 cc. de sang dans une veine et on les verse dans un tube à essai, contenant 3 cc. de citrate de sodium su 10%; on centrifuge ensuite pour éliminer le plasma. On ajoute de l'acide acétique, pour provoquer l'hémolyse, au dépôt formé par les globules rouges. On peut ainsi le semer une première fois. Le reste du dépot, est traité pendant 5 minutes avec une solution d'acide sulphurique au 15%, lavé ensuite plusieurs fois avec de l'eau distillée stérile, et enfin semé. En suivant cette méthode M. Löwenstein et ses collaborateurs (Russew, Eiselberg, Fischer, etc.) ont obtenu les résultats suivants: pourdifférentes formes de tuberculose de la peau (51 cas), les cas positifs ont été au nombre de 23: pour les cas de tuberculose miliaire, intestinale et des méninges on a eu le 100% de résultats positifs: la tuberculose pulmonaire non grave a fourni le 70% de cas positifs: les formes légères et stabilisées le 16%; la tuberculose des reins le 70%; la tuberculose du larynx le 40%.

Reitter a obtenu 17 preuves culturales positives sur 19 cas de rhumatisme articulaire aigu: 4 le furent deux fois de suite.

Ces résultats, qui en plusieurs cas ont donné le 100% de cas positifs, sont très différents de ceux que tous les autres AA. ont obtenu, et modifient profondément nos hypothèses à propos de la bacillémie du tubercule. Il m'a donc semblé intéressant d'étudier plus soigneusement ce problème. Les recherches que je décris ci-dessous furent faites sur des malades qui présentaient de profondes lésions du type fibro-sclérosant, stabilisées, sans bacilles dans l'expectoration (IIème stade de Ranke) [1].

Afin de rendre ces recherches plus complètes j'ai prélevé le sang, pour un certain nombre de ces sujets (19 cas), pendant la période des règles, pour d'autres (3 cas), lors des manifestations congestives accompagnées d'hémoptysies, et pour 4 cas pendant les manifestations typiques du rhumathisme de Poncet. Pour la technique de cette méthode j'ai rigoureusement suivi les dictamens de Löwenstein. Chaque échantillon de sang était semé en deux eprouvettes contenant du terrain de culture à l'asparagine; l'un avant, et l'autre après avoir été soumis à l'action de l'acide sulphurique. En même temps, pour compléter ces études, je faisais aussi une culture sur terrain de Petragnani et l'inoculation par voie sous-cutanée d'1 cc. à peu près de depôt, dans un jeune cobaye dont le poids etait de 200 gr. En outre, pour chaque échantillon, je faisais une autre culture sur du terrain au rouge-Congo. après avoir fait subir un traitement particulier qui m'avait donné, dans une série de recherches préliminaires avec des matériaux virulents, de meilleurs résultats que la méthode originale de Löwenstein. Je prélevais donc, avec une piqûre en veine, 10 cc. de sang que je versais sur une petite

[1] Internées à l'Institut Climatique « Eremo di Lanzo ».

quantité d'eau distillée et stérile, rendue légèrement acide (Ph = 4,5) avec de l'acide acétique afin de séparer l'hémoglobine. Je centrifugais ensuite énergiquement, je séparais le liquide surnageant, et lavais deux ou trois fois avec de l'eau distillée jusqu'à ce que j'obtenais un dépôt ayant une couleur grise claire, et ne contenant plus d'hémoglobine. J'en semais aussitôt une certaine quantité et traitais le reste avec de l'acide sulphurique au 15%, pendant 5'; je répétais alors le traitement de centrifugation, les lavages avec de l'eau distillée, légèrement alcaline cette fois, (Ph = 8), et semais enfin sur les terrains de culture. L'inoculation au thermostate, à la temperature constante de 37°, 5, fut continuée pendant 60 jours; ensuite j'examinais les cultures directement et en me servant d'une loupe. Si des colonies s'étaient développées je faisais, tout de suite une préparation colorée par la méthode Ziehl-Neelsen et je l'examinais au microscope.

J'ai ainsi étudié, en total, 40 échantillons de sang, en faisant 320 cultures. Jusqu'à aujourd'hui (car mes recherches n'ont point été abandonnées) aucune culture ne m'a donné des colonies de b. du tubercule. Les épreuves biologiques faites sur des cobayes ont aussi donné des résultats négatifs: ces animaux n'ont souffert d'aucune réaction aux glandes (à l'autopsie) semblable à la réaction atypique de l'infection tuberculeuse qui a été décrite par *Valtis-Arboing-Bernard.*

Même en tenant compte du groupe spécial de formes de tuberculose que j'ai etudiées, ces résultats sont en contradiction avec ceux de M. Löwenstein et, surtout, avec ceux de M. Fischer, qui obtint, sur des formes semblables aux mienne, une positivité du 12%. Mes recherches ne permettent, pas d'affirmer la possibilité de déceler facilement et constamment, pour toutes les formes de tuberculose pulmonaire, la présence de bacilles tuberculeux dans le sang circulant, et elles démontrent que la bacillémie est très rare lorsqu'on a des processus tuberculeux d'infiltration à caractére fibreux, même lors des périodes de crise.

Direttore responsabile: Dr. Prof. A. Zironi.